

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 5/10, 1/15, 15/63, 15/80, C12Q 1/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64567
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH99/00246 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juni 1999 (04.06.99) (30) Prioritätsdaten: 1226/98 5. Juni 1998 (05.06.98) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DISCOVERY TECHNOLOGIES LTD. [CH/CH]; Gewerbestrasse 16, CH-4123 Allschwil (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSMANN, Helmut [DE/DE]; Talweg 34, D-79540 Lörrach (DE). DÜRRENBARGER, Franz [CH/CH]; Domeckstrasse 127, CH-4143 Dornach (CH). (74) Anwalt: FREI PATENTANWALTSBÜRO; Postfach 768, CH-8029 Zürich (CH).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: TRANSFORMED CELL LINES WHICH EXPRESS HETEROLOGOUS G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

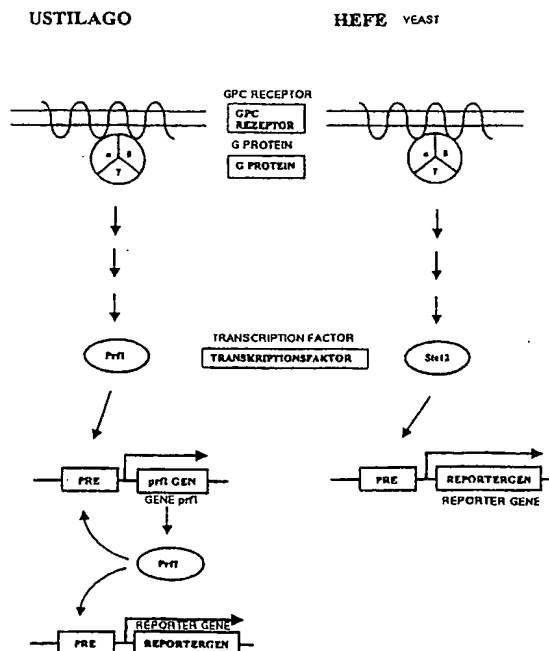
(54) Bezeichnung: TRANSFORMIERTE ZELL-LINIEN, DIE HETEROLOGE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN EXPRI-
MIEREN

(57) Abstract

According to the invention, transformed cell lines, for example of *Ustilago maydis*, are used for detecting interactions between GPC-receptors (receptors with seven transmembrane sites, which interact with guanyl nucleotide-binding, regulatory proteins) or GPC-receptor-controlled signal transmission systems and test substances (ligands, modulators), or for searching for substances which are capable of interacting with receptors or signal transmission systems of this type. The transformed cell lines have a GPC-receptor-controlled signal transduction path with positive feedback and are transformed in such a way that they express a heterologous GPC-receptor. The transformed cell lines also contain a reporter gene, the expression of which can be detected using measuring techniques and which is controlled by a promotor. Said promotor can be induced by stimulating a GPC-receptor, and is endogenous. The reporter gene is endogenous or heterologous.

(57) Zusammenfassung

Für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen GPC-Rezeptoren (Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, die mit Guanylnukleotid-bindenden, regulatorischen Proteinen interagieren) oder GPC-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungssystemen und Testsubstanzen (Liganden, Modulatoren) bzw. für das Suchen von Substanzen, die mit derartigen Rezeptoren oder Signalübermittlungssystemen eine Wechselwirkung eingehen können, werden transformierte Zell-Linien, beispielsweise von *Ustilago maydis*, eingesetzt, welche transformierten Zell-Linien einen GPC-Rezeptor-kontrollierten Signaltransduktionsweg mit positiver Rückkopplung aufweisen und derart transformiert sind, dass sie einen heterologen GPC-Rezeptor exprimieren. Ferner enthalten die transformierten Zell-Linien ein Reportergen, dessen Expression messtechnisch erfassbar ist, und welches gesteuert ist durch einen Promotor, der durch Stimulation eines GPC-Rezeptors induzierbar ist. Der durch Rezeptorstimulation induzierbare Promotor ist endogen und das Reportergen ist endogen oder heterolog.



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

TRANSFORMIERTE ZELL-LINIEN, DIE HETEROLOGE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN EXPRIMIEREN

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft transformierte Zell-Linien nach dem Oberbegriff des
5 ersten, unabhängigen Patentanspruchs, welche Zell-Linien heterologe G-Pro-
tein-gekoppelte Rezeptoren (GPC-Rezeptoren) exprimieren und sich eignen
zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen den GPC-Rezeptoren oder
den durch die GPC-Rezeptoren kontrollierten Signalübermittlungssystemen
und Substanzen (Liganden, Modulatoren), bzw. zum Auffinden von Sub-
10 stanzen, die mit den Rezeptoren oder den Signalübermittlungssystemen in
Wechselwirkung treten. Die Erfindung betrifft ferner Vektoren zur Herstel-
lung dieser Zell-Linien und die Verwendung dieser Zell-Linien zum Nachweis
der genannten Wechselwirkungen und zum Auffinden von auf die Rezeptoren
oder Signalübermittlungssysteme wirkenden Substanzen (Screening Assays).

Stand der Technik

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPC-Rezeptoren) sind Rezeptoren mit
5 sieben transmembranären Domänen, die zusammen mit heterotrimeren, Guanylnukleotid-bindenden, regulatorischen Proteinen (G-Proteine) Signaltransduktionssysteme zur Übermittlung vieler extrazellulärer Signale bilden [H.G. Dohlmann, J. Thorner, M. Caron, and R. J. Lefkowitz (1991) Annu. Rev. Biochem., 60, 653-688]. Derartige Signaltransduktionssysteme kommen in
10 einem breiten Spektrum von Organismen vor, angefangen bei einfachen Pilzen bis zum Menschen.

Ein Beispiel eines derartigen Rezeptors ist der Somatostatin-Rezeptor, der
15 einen Prototyp der GPC-Rezeptoren in Säugerzellen darstellt. Somatostatin hat weitreichende modulatorische Wirkungen im zentralen Nervensystem und im peripheren Gewebe und wirkt auf eine Reihe von Rezeptor-Subtypen.

20 Die Signalübermittlung durch ein Signalübermittlungssystem mit GPC-Rezeptor und G-Protein hat die folgenden generellen Merkmale: Heterotrimere G-Proteine funktionieren als Signalübermittler zwischen einem transmembranären Rezeptor Molekül (GPC-Rezeptor) und einem als Effektor bezeichneten Enzym, das einen sekundären Botenstoff produziert. Adenylatzyklase, PhospholipaseC und Ionenkanäle sind Beispiele gut untersuchter Effektoren in
25 Säugetier-Systemen.

G-Proteine bestehen aus einer Guanylnukleotid-bindenden α -Untereinheit,
30 einer β -Untereinheit und einer γ -Untereinheit ($G\alpha$ -, $G\beta$ -, $G\gamma$ -Untereinheit) [M. I. Simon, M. P. Strathmann and N. Gautam (1991) Science, 252, 802-808].

G-Proteine existieren in zwei unterschiedlichen Formen, abhängig davon, ob GDP oder GTP an die α -Untereinheit gebunden ist. Wenn GDP gebunden ist, kommt das G-Protein als heterotrimerer $\alpha\beta\gamma$ -Komplex vor. Durch die Bindung von GTP an das G-Protein, dissoziiert die α -Untereinheit und lässt
5 einen $\beta\gamma$ -Komplex zurück. Assoziation eines $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexes mit einem aktivierten GPC-Rezeptor in der Zellmembran führt zu einer Erhöhung der Austauschrate von GTP für gebundenes GDP. Als Folge erhöht sich die Dissoziationsrate der gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit vom $G\beta\gamma$ -Komplex. Die freie α -Untereinheit und der $G\beta\gamma$ -Komplex können Signale an zelluläre Effektoren
10 verschiedener Signalübermittlungswege weiterleiten.

Die GPC-Rezeptoren stellen wichtige Zielmoleküle für therapeutische Verbindungen dar. Das menschliche Genom enthält vermutlich etwa 5000 verschiedene GPC-Rezeptor-Gene, auf die neue therapeutische Verbindungen als
15 Liganden wirken könnten. Für die Untersuchung derartiger Wechselwirkungen von Liganden und Rezeptoren und auch von Modulatoren und entsprechenden Signalübermittlungssystemen werden Screening Testsysteme verwendet, in denen gemäss dem Stande der Technik biochemische Ligandenbindungs-Studien, Reportersysteme in Säugetierzellen, oder Reportersysteme in Hefezellen
20 zur Anwendung kommen.

In solchen Testsystemen verwendete Hefezellen sind derart transformiert, dass sie heterologe GPC-Rezeptoren exprimieren. In der Publikation WO-
25 92/05244 (US-5739029) werden derartige Hefezellen beschrieben. Diese enthalten eine erste heterologe DNA-Sequenz, die einen heterologen GPC-Rezeptor exprimiert, und eine zweite heterologe DNA-Sequenz, die eine α -Untereinheit eines Säuger-G-Proteins exprimiert.

Die endogenen GPC-Rezeptoren in Hefezellen vermitteln die Erkennung von unterschiedlichen Zelltypen via extrazelluläre Peptide, sogenannte Pheromone. Der Pheromon-aktivierte Signalübermittlungsweg leitet ein Entwicklungsprogramm ein, welches zur Verschmelzung von haploiden α - und a-Zellen und zur Ausbildung diploider α /a-Zellen führt [M. Whiteway and B. Errede (1993) in: Signal Transduction, Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems, ed. J. Kurjan and B. L. Taylor, Academic Press, pp. 189-237]. Zellen des Kreuzungstyps α sekretieren α -Faktor, welcher in a-Zellen an den α -Faktor-Rezeptor (Ste2) bindet, und Zellen des Kreuzungstyps a sekretieren a-Faktor, welcher in α -Zellen an den spezifischen a-Faktor Rezeptor (Ste3) bindet. Sowohl Ste2 als auch Ste3 gehören zur Familie der GPC-Rezeptoren. Nach der Bindung des Pheromons an den entsprechenden Rezeptor ändert der Pheromon-Rezeptor wahrscheinlich seine Konformation. Dies führt zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit (Gpa1) vom $G\beta\gamma$ -Komplex (Ste4, Ste18) und somit zur Aktivierung des G-Proteins. Interessanterweise - und im Gegensatz zur Funktion von G-Proteinen in Säugetier Systemen - übt die $G\alpha$ -Untereinheit in Hefe einen negativen Einfluss auf die Signalübermittlung aus, während die $G\beta\gamma$ -Untereinheit das Pheromon-Signal weiterleitet.

Ein weiterer, grundlegender Unterschied zwischen GPC-Rezeptor-kontrollierter Signaltransduktion in Säugetieren und in Hefe besteht darin, dass bis jetzt in Hefezellen noch kein Effektor-Enzym entdeckt worden ist, welches einen sekundären Botenstoff generiert als Reaktion auf Rezeptorstimulation. Wahrscheinlich leitet der $\beta\gamma$ -Komplex das Pheromonsignal direkt weiter an die Ste20-Proteinkinase, welche wiederum eine Proteinkinasen-Kaskade aktiviert, bestehend aus Ste11, Ste7, Fus3 und Kss1, und dem "Gerüst"-Protein Ste5 [I. Herskowitz (1995) Cell, 80, 187-197].

Zu den zellulären Konsequenzen der Pheromon-Stimulation in Hefe gehören die transkriptionelle Induktion einer ganzen Reihe von Genen und der Stillstand des Zellzyklus. Diese Pheromon-induzierbaren Gene kodieren für Produkte, die für die Biosynthese der Pheromone benötigt werden (MFA1, MFA2, MFa1, MFa2, STE6, STE13), für die Produktion der Rezeptoren STE2 und STE3, für die Pheromon-Signalübermittlung (GPA1, FUS3), für Zellzyklus-Stillstand (FAR1, CLN2, CLN3), für morphologische Veränderungen und Zellfusion (FUS1, FUS2, CHS1) und für Pheromon-Desensibilisierung (SST2, BAR1).

Pheromon-kontrollierte Transkription wird durch das sequenzspezifische DNA-Bindungsprotein Ste12 vermittelt. Die Transkription des STE12-Gens ist nicht durch Pheromon induzierbar. Es wird vermutet, dass die funktionell redundanten MAP-Kinase-Homologe Fus3 und Kss1 des Pheromon-Signalübermittlungswegs den Transkriptionsfaktor Ste12 durch spezifische Phosphorylation aktivieren. Pheromon-induzierbare Gene weisen cis-wirkende DNA-Sequenzen in ihrer Promotorregion auf, das sogenannte "Pheromon Response Element" (PRE). Das Vorkommen von PRE-Sequenzen in der Promotorregion eines Gens in Hefe genügt jedoch nicht, dass die Transkription dieses Gens Pheromon-induzierbar ist. So hat z.B. das STE12-Gen mehrere PREs, aber die Expression von STE12 ist nicht Pheromon-induzierbar.

Grundzüge der Erfindung

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, transformierte Zell-Linien (humane, tierische oder pflanzliche Zellen sowie auch Pilzzellen), die heterologe GPC-Rezeptoren exprimieren, zu schaffen. Diese transformierten Zell-Linien sollen

sich eignen für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Substanzen (Liganden, Modulatoren) und GPC-Rezeptoren bzw. GPZ-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungssystemen bzw. zum Auffinden von auf die Rezeptoren bzw. die Signalübermittlungssysteme wirkenden Substanzen in Screening
5 Assays. Um für diesen Zweck geeignet zu sein, sollen die transformierten Zellen eine hohe Sensitivität auf eine derartige Wechselwirkung zeigen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die transformierten Zellen-Linien, wie sie in
10 den Patentansprüchen definiert sind.

Die erfindungsgemässen Zell-Linien (humane, tierische oder pflanzliche Zellen sowie auch Pilzzellen) weisen ein durch einen Liganden aktivierbares
15 Signalübermittlungssystem mit GPC-Rezeptoren auf, welches Signalübermittlungssystem eine positive Rückkoppelung zeigt. Der Mechanismus der positiven Rückkoppelung besteht darin, dass die Transkription desjenigen Gens, das für den GPC-Rezeptor-aktivierbaren Transkriptionsfaktor kodiert, selbst durch Rezeptor-Stimulation induzierbar ist.

20

Die erfindungsgemässen Zell-Linien können natürlicherweise ein solches GPC-Rezeptor-Signalübermittlungssystem mit positiver Rückkoppelung aufweisen oder ein positiver Rückkoppelungsmechanismus kann mittels rekombinanter DNA-Technologie in eine bestehende GPC-Rezeptor-Signalübermittlungskette eingebaut werden. Dadurch weist das natürliche oder entsprechend
25 modifizierte Signaltransduktionssystem mit positivem Rückkoppelungsmechanismus eine gegenüber bekannten, zellulären Nachweissystemen bedeutend höhere Sensitivität auf, die für den Nachweis der genannten Wechselwirkungen ausgenutzt werden kann. Zell-Linien mit einem derartigen, positiven
30 Rückkoppelungsmechanismus reagieren also sensitiver als die entsprechenden,

bekannten zellulären Nachweissysteme auf eine Aktivierung der GPC-Rezeptoren, ungeachtet, ob diese Rezeptoren die endogenen sind oder durch Transformation eingeführte heterologe Rezeptoren.

5

Der Maisbrand-Pilz *Ustilago maydis* ist ein Beispiel eines zellulären Testsystems für GPC-Rezeptoren, in dem ein positiver Rückkoppelungsmechanismus in der GPC-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungskette natürlicherweise besteht. Diese positive Rückkoppelung in der Pheromon-aktivierbaren Signaltransduktion wird für *Ustilago maydis* beschrieben von H. A. Hartmann, R. Kahmann and M. Bölker [EMBO J., 15, 1632-1641 (1996)]. Der Basidiomycet *Ustilago maydis* wird als eukaryontischer Modellorganismus genutzt. Er verursacht in seiner pathogenen Form den Maisbrand auf seiner Wirtspflanze Mais und dient aus diesem Grunde auch als Modellsystem zum Studium von pathogenen Pilzen. Die genetische Konstitution von *U. maydis* kann relativ leicht verändert werden [F. Banuette (1995) Annu. Rev. Genet., 29, 179-208].

Es ist anzunehmen, dass auch andere Zell-Linien, insbesondere Pilze der *Ustilago*-Familie oder der Basidiomyceten überhaupt, derartige GPC-Rezeptor-aktivierbare Signaltransduktionswege mit positiver Rückkoppelung aufweisen und sich dadurch wie *Ustilago maydis* natürlicherweise für die genannten Nachweisreaktionen anbieten.

25

Gemäss Erfindung werden also für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen bestimmten GPC-Rezeptoren bzw. entsprechenden Signalübermittlungssystemen und Testsubstanzen Zell-Linien verwendet, die in ihrem natürlichen oder in einem gentechnisch modifizierten Zustand ein GPC-Rezeptor-aktivierbares Signalübermittlungssystem aufweisen, in dem die GPC-Rezeptor-induzierte Transkription von Zielgenen durch Rückkoppelung

30

verstärkt ist. Ferner weisen sie ein endogenes oder heterologes Reportergen auf, dessen Expression von einem Promotor gesteuert ist, der durch Aktivierung des Rezeptors induzierbar ist, wobei die Expression des Reportergens messtechnisch erfassbar ist (z.B. essentielles Wachstumsenzym, durch das messbares Zellwachstum bewirkt wird, oder andere Enzyme, die in biochemischen Reaktionen zu messbaren Wirkungen führen).

In den Zellen der erfindungsgemässen Zell-Linien kann der heterologe GPC-Rezeptor sich mit endogenem G-Protein assoziieren oder mit heterologem G-Protein, insbesondere mit einer heterologen α -Untereinheit des G-Proteins. Die Zelle kann zusätzlich eine Mutation in demjenigen Gen enthalten, welches die für die GPC-Rezeptor-kontrollierte Signalübermittlung verantwortliche endogene α -Untereinheit inaktiviert und dabei die Interaktion zwischen dem heterologen Rezeptor und dem heterologen G-Protein erleichtert.

Kurze Beschreibung der Figuren

20

Figur 1 zeigt den Vergleich zwischen einem Signalübermittlungssystem mit positiver Rückkoppelung (links), wie es die erfindungsgemässen Zell-Linien aufweisen (z.B. *Ustilago maydis*), und einem Signalübermittlungssystem ohne positive Rückkoppelung (rechts), wie es beispielsweise Hefezellen aufweisen.

25

30

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Der Begriff "heterolog" wird in der vorliegenden Beschreibung in Bezug auf die jeweiligen Zell-Linien benutzt und bezieht sich demzufolge auf DNA-Sequenzen, Proteine und andere Materialien, die von anderen Organismen in
5 die jeweilige Zell-Linie eingebracht werden, oder auf Kombinationen, die nicht natürlicherweise in den jeweiligen Zell-Linien vorkommen.

Die Begriffe "stromaufwärts" und "stromabwärts" werden im Folgenden in Bezug auf die Richtung der Transkription und der Translation benutzt. Eine
10 Sequenz, die vor einer anderen Sequenz transkribiert oder translatiert wird, wird als "stromaufwärts" von der anderen Sequenz bezeichnet.

15 Methoden und Materialien, mit deren Hilfe die erfindungsgemässen Zell-Linien hergestellt werden, werden für das Beispiel *Ustilago maydis* im Detail beschrieben. Dies soll die erfindungsgemässen Zell-Linien aber in keiner Weise auf diese Spezies beschränken. Für andere Zell-Linien sind die Methoden und Materialien entsprechend anzuwenden, was für den Fachmann ohne
20 Probleme möglich ist.

Für *Ustilago maydis* wird natürlicherweise die Erkennung und Fusion von kompatiblen Zelltypen (a1 und a2) durch ein Signalübermittlungssystem ermöglicht, wie dies eingangs auch für die Hefe beschrieben wurde. Dieses
25 Signalübermittlungssystem wird durch Pheromone und die entsprechenden Pheromonrezeptoren kontrolliert [J. Kronstad and C. Staben (1997) *Annu. Rev. Genet.*, 31, 245-276]. Zellen von *Ustilago maydis* mit dem Kreuzungstyp a1 sekretieren das Peptid-Pheromon Mfa1, welches in a2-Zellen an den spezifischen Mfa1-Rezeptor (Pra2) bindet. Zellen des Kreuzungstyps a2 sekretieren
30 das Mfa2-Pheromon, welches nur in a1-Zellen wirkt, die den Mfa2-Rezeptor

(Pra1) exprimieren. Bei den Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 handelt es sich um GPC-Rezeptoren.

5 Aktivierung der Rezeptoren Pra1 und Pra2 durch Bindung des entsprechenden Pheromons führt wahrscheinlich zur Dissoziation eines heterotrimeren G-Proteins, von dem bis jetzt nur die α -Untereinheit Gpa3 bekannt ist [E. Regenfelder, T. Spellig, A. Hartmann, S. Lauenstein, M. Bölker and R. Kahmann (1997) EMBO J., 16, 1934-1942]. Gpa3 - im Gegensatz zum funktionel-

10 len Homolog in Hefe (Gpa1) - übt einen positiven Einfluss auf die Pheromon-Signalübermittlung aus. Interessanterweise scheint der zelluläre Effektor von Gpa3 eine Adenylatzyklase zu sein (Uac1), da Mutationen im gpa3-Gen einerseits die Pheromon-Signalübermittlung verunmöglichen und andererseits zu filamentösem Wachstum führen, welches an das Wachstum von Adenylatzyklase-defizienten Mutanten erinnert. Des weiteren kann das filamentöse

15 Wachstum von gpa3-Mutanten rückgängig gemacht werden durch Zugabe von cyclischem AMP, dem sekundären Botenstoff, der von der Adenylatzyklase produziert wird [R. Kahmann and C. Basse (1997) Trends in Plant Sci., 2, 366-368; S. Gold, G. Duncan, K. Barrett and J. Kronstad (1994) Genes Dev., 8, 2805-2816]. Demzufolge scheint die Pheromon-Signalübermittlung in Ustilago den entsprechenden Mechanismen in Säugetier-Systemen ähnlicher zu sein als dies der Fall ist für die Pheromon-kontrollierte Signalübermittlung in Hefe.

25 Pheromon-Stimulation in Ustilago resultiert letztendlich in der transkriptionellen Induktion aller Gene, die sich an den Kreuzungstypen-Loci a und b befinden, d.h. mfa1, mfa2, pra1, pra2, lga2, rga2, bE, bW [M. Urban, R. Kahmann and M. Bölker (1996) Mol. Gen. Genet., 251, 31-37]. All diese Gene besitzen

30 in ihren assoziierten genregulatorischen Regionen mindestens eine cis-wirkende DNA-Sequenz, das "Pheromon Response Element" (PRE). Die PRE-Se-

quenzen von *Ustilago maydis* werden vom sequenzspezifischen DNA-Bindungsprotein Prf1 erkannt. Pheromon-Stimulation führt zur Aktivierung von Prf1, welches die Pheromon-induzierbare Transkription dieser Gene vermittelt. Da der Promotor des *prf1*-Gens selbst auch PREs aufweist, wird auch die

5 Transkription des *prf1*-Gens durch Pheromon-Stimulation aktiviert (H. A. Hartmann, R. Kahmann and M. Bölker (1996) EMBO J., 15, 1632-1641). Durch die Pheromon-induzierbare Transkription des *prf1*-Gens ist dem Pheromon-Signalübermittlungsweg von *Ustilago* ein positiver Rückkoppelungsmechanismus inhärent.

10

GPC-Rezeptor-kontrollierte Signalübermittlungssysteme mit positiver Rückkoppelung sind daran zu erkennen, dass die Transkription des Gens, das für denjenigen Transkriptionsfaktor kodiert, der durch Stimulation des GPC-Rezeptors aktiviert wird und dadurch die GPC-Rezeptor-kontrollierte Trans-

15 kription von Zielgenen steuert, selbst auch induziert wird durch Stimulation des GPC-Rezeptors.

20 Der oben beschriebene Mechanismus ist in der Figur 1 links schematisch dargestellt. Dieser Mechanismus führt zu einer bedeutend höheren Sensitivität, mit der beispielsweise eine Bindung von Liganden an den Rezeptor wahrgenommen werden kann. Wie bereits oben erwähnt und wie in der Figur 1 rechts als Vergleich dargestellt, fehlt dem entsprechenden Hefesystem und

25 anderen bekannterweise angewendeten, zellulären Nachweissystemen ein derartiger positiver Rückkoppelungsmechanismus. Im entsprechenden Mechanismus der Hefe wird die Expression des GPC-Rezeptor-aktivierbaren Transkriptionsfaktors (Ste12) nicht induziert durch Rezeptor-Stimulation (siehe Fig.1).

30

Es ist jedoch durchaus denkbar, Hefestämme, die zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen heterologen Rezeptoren und Liganden benutzt werden, so zu modifizieren, dass sie einen positiven Rückkoppelungsmechanismus aufweisen. Um dies zu erreichen, kann der Promotor des STE12-Gens, welches
5 für den durch Pheromon-Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktor kodiert, durch einen Promotor ersetzt werden, der Pheromon-induzierbar ist (z.B. FUS1-Promotor).

10 Verschiedene Ustilago-Stämme und geeignete Expressionsvektoren für die Transformation von Ustilago sind bekannt. Expressionsvektoren sind replizierbare DNA-Konstrukte, die benutzt werden, um eine heterologe DNA-Sequenz in einer Wirtszelle zu exprimieren. Die zu exprimierende heterologe DNA-Sequenz muss mit geeigneten Kontrollsequenzen ausgestattet sein, welche
15 fähig sind, die Expression eines durch die heterologe DNA-Sequenz kodierten Proteins oder Proteinuntereinheit im beabsichtigten Wirt zu steuern. Kontrollsequenzen umfassen einen transkriptionellen Promotor, fakultative cis-wirkende DNA-Sequenzen, um die Transkription zu regulieren, geeignete DNA-Sequenzen, welche eine effiziente Initiation der Translation vermitteln, und
20 DNA-Sequenzen, welche die Termination der Transkription und die Polyadenylierung der mRNA steuern.

Geeignete Vektoren, für die Herstellung von erfindungsgemässen Zell-Linien
25 umfassen Plasmide, Viren und integrierbare DNA-Fragmente, d.h. DNA-Fragmente, die in das Wirtsgenom integrierbar sind via genetische Rekombination. Geeignete Vektoren enthalten Kontrollsequenzen, welche von Spezies stammen, die im beabsichtigten Expressionswirt funktionell sind.

Ustilago-Vektoren können eine autonom replizierende Sequenz (UARS) enthalten, welche das Plasmid befähigt, in hoher Kopienzahl in der Ustilago-Zelle zu replizieren, einen Promotor, heterologe DNA-Sequenzen, die für die zu exprimierenden heterologen Proteine kodieren, Sequenzen für die Polyadenylierung und ein selektierbares Markergen.

Ein Beispiel eines solchen Plasmids ist pJW42 [J. Wang, D. W. Holden and S. A. Leong (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 865-869]. Dieses Plasmid enthält das hph-Gen von Escherichia coli [L. Gritz and J. Davies (1983) Gene, 25, 179-188], welches Resistenz gegen das Antibiotikum HygromycinB vermittelt und dadurch als selektierbarer Marker genutzt werden kann. Andere, anwendbare Markergene sind beispielsweise das cbx-Gen von Ustilago maydis, das Resistenz gegen das Fungizid Carboxin vermittelt [P.L.E. Broomfield and J.A. Hargreaves (1992) Curr. Genet., 22, 117-121], oder das nat1-Gen von Streptomyces noursei, das Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin vermittelt [H. Krüger, G. Fiedler, C. Smith and S. Baumberg (1993) Gene, 127, 127-131].

Geeignete Promotor Sequenzen umfassen die Promotoren des hsp70-Gens [D. W. Holden, J. W. Kronstad and S. A. Leong (1989) EMBO J., 8, 1927-1934], des Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Gens [T. L. Smith and S. A. Leong (1990) Gene, 93, 111-117] und des Translation-Elongationsfaktor-Gens [H. A. Hartmann, R. Kahmann and M. Bölker (1996) EMBO J., 15, 1632-1641]. Andere Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil der transkriptionellen Kontrolle durch die Wachstumsbedingungen sind der Promotor des crg1-Gens [A. Bottin, J. Kämper and R. Kahmann (1996) Mol. Gen. Genet., 253, 342-352], welcher durch Arabinose induziert und durch Glukose reprimiert wird, und der Promotor des sid1-Gens, welcher negativ reguliert ist durch die Eisen-Konzentration im Wachstumsmedium [Z. An, B. Mei, W. M. Yuan and S.

A. Leong (1997) EMBO J., 16, 1742-1750]. Um die Polyadenylierung und die Termination der mRNA zu gewährleisten, können auch die Terminationssequenzen, die mit diesen Genen assoziiert sind, stromabwärts der heterologen Sequenzen in die Expressionsvektoren ligiert werden.

5

Um die effiziente Expression von heterologen GPC-Rezeptoren in *Ustilago* zu ermöglichen, wurden neuartige Expressionsvektoren entwickelt. Diese Expressionsvektoren enthalten *Ustilago maydis* hsp70-Promotor und -Terminator, welche die Transskription der cDNAs für GPC-Rezeptoren vermitteln. Zwischen dem hsp70-Promotor und -Terminator werden zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt, um die Klonierung von zu exprimierenden DNA-Segmenten, z.B. GPCR-cDNAs, zu vereinfachen.

15

Um die intrazelluläre Lokalisierung der heterologen GPC-Rezeptoren zu der Plasmamembran in *Ustilago* zu optimieren, ist es auch möglich, Expressionsvektoren zu konstruieren, die ein erstes Segment enthalten, welches *Ustilago*-DNA-Sequenzen umfasst, die mindestens ein Segment der aminoterminalen kodierenden Sequenz eines *Ustilago*-GPC-Rezeptors beinhalten. DNA-Sequenzen, die für Pheromon-Rezeptoren von *Ustilago* kodieren (z.B. das *pra1*-Gen, das für den Mfa2-Pheromon-Rezeptor kodiert, und das *pra2*-Gen, das für den Mfa1-Pheromon-Rezeptor kodiert) sind Beispiele für *Ustilago*-Gene, die für GPC-Rezeptoren kodieren, welche benutzt werden können, um solche Vektoren zu konstruieren. Ein zweites Segment, das stromabwärts des genannten ersten Segments liegt und im korrekten Leseraster mit diesem ist, umfasst eine DNA-Sequenz, die für einen heterologen GPC-Rezeptor kodiert. Solche Anpassungen der Translationsinitiationsstelle können die Expression eines heterologen Proteins erhöhen. Die ersten und zweiten Segmente sind funktionsfähig assoziiert mit einem Promotor, wie z.B. dem konstitutiven

30

hsp70-Promotor oder dem induzierbaren crg1-Promotor, welche funktionsfähig sind in Ustilago-Zellen.

5 Jeder GPC-Rezeptor und die entsprechenden DNA-Sequenzen, die für diese Rezeptoren kodieren, können benutzt werden, um die erfindungsgemässen Zell-Linien herzustellen. Beispiele solcher Rezeptoren sind adrenerge Rezeptoren (α oder β), Adenosin-Rezeptoren, Angiotensin-Rezeptoren, Bradykinin-Rezeptoren, Cannabinoid-Rezeptoren, Chemokin-Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren, Glukagon-Rezeptoren, Neurokinin-Rezeptoren, Neurotensin-Rezeptoren, Serotonin-Rezeptoren, Opiat-Rezeptoren, muskarinische Rezeptoren, Somatostatin-Rezeptoren und Vasopressin-Rezeptoren. Der hier benutzte Begriff "Rezeptor" schliesst auch Subtypen sowie deren Mutanten und Homologe ein und auch die DNA-Sequenzen, die für diese kodieren.

15

Jede $G\alpha$ -Untereinheit und die entsprechenden DNA-Sequenzen, die für diese $G\alpha$ -Untereinheiten kodieren, können benutzt werden, um die erfindungsgemässen Zell-Linien herzustellen. Beispiele solcher $G\alpha$ -Untereinheiten sind Gs-Untereinheiten, Go-Untereinheiten, Gq-Untereinheiten, Gi-Untereinheiten und Gz-Untereinheiten. Der hier benutzte Begriff " $G\alpha$ -Untereinheit" schliesst Subtypen sowie deren Mutanten und Homologe ein und auch DNA-Sequenzen, die für diese kodieren. Die funktionelle Expression solcher heterologer $G\alpha$ -Untereinheiten in Ustilago kann leicht überprüft werden, da ein Defekt in der Ustilago $G\alpha$ -Untereinheit Gpa3 zu einem charakteristischen, visuell beobachtbaren filamentösen Wachstum führt, im Gegensatz zur hefeartigen Wachstumsform von Ustilago-Zellen mit einem intakten gpa3-Gen. Heterologe $G\alpha$ -Untereinheiten, welche die Funktion der endogenen $G\alpha$ -Untereinheit Gpa3 in der Pheromon-Signalübermittlungskette übernehmen, komplementieren den filamentösen Wachstumsdefekt der gpa3 mutanten Zellen

30

zu normalem, hefeartigem Wachstum und können somit leicht identifiziert werden.

- 5 Jede G β γ -Untereinheit und die entsprechenden DNA-Sequenzen, die für diese G β γ -Untereinheiten kodieren, können benutzt werden, um die erfindungsgemässen Zell-Linien herzustellen. Der hier benutzte Begriff "G β γ -Untereinheit" schliesst Subtypen sowie deren Mutanten und Homologe ein und auch DNA-Sequenzen, die für diese kodieren.

10

- Um die Bindung eines Liganden an einen heterologen GPC-Rezeptor oder allgemein die Wechselwirkung zwischen einem Modulator und dem GPC-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungssystem in erfindungsgemässen Zell-Linien nachzuweisen, ist es besonders zweckdienlich, die Zellen mit einem dritten DNA-Konstrukt auszustatten, welches einen Promotor und ein Reporter-gen umfasst. Der Promotor ist induzierbar durch die Aktivierung des heterologen GPC-Rezeptors. Das Reporter-gen ist stromabwärts vom GPC-Rezeptor-induzierbaren Promotor plaziert und funktionsfähig mit diesem assoziiert. Die Expression des Reporter-gens ist messtechnisch erfassbar und widerspiegelt die Aktivierung des heterologen GPC-Rezeptors durch geeignete Liganden. Im beispielhaften *Ustilago maydis* System können z.B. der Promotor des *mfa1*-Gens, der Promotor des *mfa2*-Gens, der Promotor des *pra1*-Gens, der Promotor des *pra2*-Gens oder der Promotor des *prf1*-Gens als GPC-Rezeptor-induzierbare Promotoren benutzt werden. Auch können verschiedene, endogene oder heterologe Gene als Reportergene benutzt werden. Beispiele für Reportergene sind das *pyr6*-Gen [J. W. Kronstad, J. Wang, S. F. Covert, D. W. Holden, G. L. McKnight and S. A. Leong (1989) *Gene*, 79, 97-106], das *pyr3*-Gen [A. Spanos, N. Kanuga, D. W. Holden and G. R. Banks (1992) *Gene*, 117, 73-79], das *lacZ*-Gen, das *hph*-Gen (Hygromycin-Resistenz) [L. Gritz and J. Davies (1983) *Gene*, 25, 179-188], das *ble*-Gen (Phleomycin-
- 15
20
25
30

Resistenz) [D. Drocourt, T. Calmels, J. P. Reynes, M. Baron and G. Tiraby (1990) Nucl. Acids Res., 18, 4009], ein GFP-Gen (Green Fluorescent Protein) [T. Spellig, A. Bottin and R. Kahmann (1996) Mol. Gen. Genet., 225, 503-509] oder das uidA (GUS) Gen [R. A. Jefferson, S. M. Burgess and D. Hirsh
5 (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8447-8451].

10 Beispiel 1:

Herstellung von *Ustilago* Expressionsvektoren (pDT78 und pDT99)

Um die Expression von heterologen GPC-Rezeptoren in *U. maydis* zu ermög-
15 lichen, wurden die *Ustilago* Expressionsvektoren pDT78 und pDT99 konstruiert.

Für den Expressionsvektor pDT78 wurde das 3.1 kb *Hind*III Fragment des
20 autonom replizierenden *Ustilago* Vektors pCM54 [T. Tsukuda, S. Carleton, S. Fotheringham and W. K. Holloman (1988) Mol. Cell. Biol., 8, 3703-3709] durch ein 2 kb *Hind*III Fragment des Plasmids pDWH10 [J. Wang, D.W. Holden and S. A. Leong (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 865-869] ersetzt. Dieses 2 kb *Hind*III Fragment enthält den Promotor und den Transkriptionsterminator des *U. maydis hsp70* Gens, getrennt durch eine *Bgl*II Schnittstelle. Das resultierende Plasmid, pDT48, wurde mit *Sac*I und *Pst*I geschnitten, und ein 1.5 kb *Sac*I-*Pst*I Fragment, isoliert vom Plasmid pNAT1 (pDT65), wurde eingefügt, welches das *nat1* Gen von *Streptomyces noursei* enthält, das
25 Resistenz gegen das Antibiotikum der Streptothricin Familie Nourseothricin vermittelt [H. Krügel, G. Fiedler, C. Smith and S. Baumberg (1993) Gene, 127, 127-131]. Die Expression des *nat1* Gens in *U. maydis* wird durch den
30

Promotor des *U. maydis* Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) Gens [T.L. Smith and S.A. Leong (1990) *Gene*, 93, 111-117] und den Transkriptions-Terminator des *cyc1* Gens von *Saccharomyces cerevisiae* [D. Drocourt, T. Calmels, J.P. Reynes, M. Baron and G. Tiraby (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 4009] gesteuert. Das daraus resultierende Plasmid pDT78 besitzt eine
5 einzige Schnittstelle für *Bgl*II zwischen dem *U. maydis hsp70* Promotor und dem *U. maydis hsp70* Terminator. Diese Restriktionsenzym-Schnittstelle kann dazu benützt werden um eine in *U. maydis* zu exprimierende DNA Sequenz einzufügen, z.B. eine cDNA, welche für einen heterologen GPC-Rezeptor
10 kodiert. Die Transkription der cDNA, die den heterologen GPC-Rezeptor spezifiziert, wird somit durch die Transkriptions-Kontrollsequenzen des *U. maydis hsp70* Promotors vermittelt. Der pDT78 Expressionsvektor und dessen Derivate können mittels publizierten Transformations-Methoden in *Ustilago maydis* eingeführt werden [J. Wang, D.W. Holden and S. A. Leong (1988)
15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 865-869] und mittels Beifügen des Antibiotikums Nourseothricin (40 µg/ml) ins Wachstumsmedium wird für die Präsenz dieses Plasmids in *U. maydis* Zellen selektioniert.

20 Um die Klonierung von in *Ustilago* zu exprimierenden DNA Sequenzen zu vereinfachen, wurden weitere Expressionsplasmide mit dem *hsp70* Promotor konstruiert, welche aber zwischen dem *hsp70* Promotor und Terminator statt nur einer Restriktionsschnittstelle, wie z.B. pDT78, Schnittstellen für mehrere verschiedene Restriktionsenzyme besitzen. Dies wird hier am Beispiel von
25 pDT99 veranschaulicht.

pDT49 ist identisch mit dem oben beschriebenen pDT48, ausser dass das 2 kb *Hind*III Fragment, welches den Promotor und den Transkriptions-Terminator
30 des *U. maydis hsp70* Gens enthält, in der umgekehrten Orientierung eingeführt wurde, d.h. der *E. coli lacZ* Promotor des Plasmids und der eingeführte

hsp70 Promotor vermitteln die Transkription in entgegengesetzter Richtung. Um die *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I und *Pst*I Schnittstellen von pDT49 zu eliminieren, wurde pDT49 mit *Sma*I und mit *Pst*I verdaut, der 3'-Überhang der *Pst*I Schnittstelle wurde mit T4 DNA Polymerase entfernt und das Plasmid wurde
5 religiert. In die *Bgl*II Schnittstelle zwischen dem *hsp70* Promotor und Terminator des resultierenden Plasmids pDT85 wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid, welches Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Kpn*I, *Eco*RI, *Not*I, *Nco*I, *Mlu*I, *Stu*I, *Sph*I, *Bam*HI und *Sac*II (in dieser Reihenfolge) enthält, so ein-ligiert, dass die *Sac*II Schnittstelle näher beim *hsp70* Promotor zu lie-
10 gen kam als die *Kpn*I Schnittstelle. In das resultierende Plasmid pDT90 wurde in die *Sac*I Schnittstelle ein 2.3 kb *Sac*I Fragment des Plasmids pjahCbx8 eingebracht, welches ein Gen enthält, das in *U. maydis* Resistenz gegen das Fungizid Carboxin vermittelt [P.L.E. Broomfield and J.A. Hargreaves (1992) Curr. Genet., 22, 117-121]. pDT99 kann mittels Transformation in *U. maydis*
15 Zellen eingebracht werden [J. Wang, D.W. Holden and S. A. Leong (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 865-869] und mittels Beifügen des Fungizids Carboxin (2 µg/ml) ins Wachstumsmedium wird für die Anwesenheit dieses Plasmids in *U. maydis* Zellen selektioniert.

20

Beispiel 2:**Expression des humanen β 2-adrenergen Rezeptors in *U. maydis* (pDT94)**

25

Um den humanen β 2-adrenergen Rezeptor (β 2-AR) in *U. maydis* zu exprimieren, wurden ca. 0.1 µg DNA des Plasmids pTF3 [B.K. Kobilka, R.A.F. Dixon, T. Frielle, H.G. Dohlman, M.A. Bolanowski, I.S. Sigal, T.L. Yang-Feng, U. Francke, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84,
30 46-50] welches eine cDNA des humanen β 2-adrenergen Rezeptors enthält, mit den Primern 5'-CGGGATCCACAATGACCCAACCCGGCAACGGCAGCG-

3' und 5'-CGGGATCCTCAGAGCAGCGAGTCATTTGTGCTACA-3' (wo-
bei A = Adenosin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymidin) mittels der
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Im Vergleich zur humanen
DNA Sequenz des β 2-adrenergen Rezeptors, wurde insbesondere die Umge-
5 bung des Translations-Initiations ATG Kodons so verändert, dass sie der
entsprechenden Konsensus-Sequenz für filamentöse Pilze entspricht [D. J.
Ballance (1991) in Molecular Industrial Mycology: Systems and Applications
for Filamentous Fungi; S.A: Leong and R.M. Berka (eds.), Dekker, New
York, pp 1-29]. Das resultierende 1.2 kb PCR Produkt wurde mit *Bam*HI ver-
10 daut und in die *Bam*HI Schnittstelle des mit *Bam*HI linearisierten und de-
phosphorylierten Vektors pBLUESCRIPTII KS+ (Stratagene Inc.) kloniert.
Die DNA Sequenz des somit klonierten 1.2 kb *Bam*HI β 2-AR PCR Produkts
wurde verifiziert. Das 1.2 kb *Bam*HI Fragment des resultierenden Plasmids
pDT87 wurde dann in die *Bgl*III Schnittstelle des Expressionsvektors pDT78 so
15 eingefügt, dass die β 2-AR Sequenz in der richtigen Orientierung vom *hsp70*
Promotor transkribiert wird. Das resultierende β 2-AR-Expressionsplasmid
pDT94 kann nun mittels publizierten Transformations-Methoden [J. Wang,
D.W. Holden and S. A. Leong (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 865-869]
in *U. maydis* Zellen eingeführt werden.

20

Der biochemische Nachweis, dass der humane β 2-AR in *U. maydis* exprimiert
wird kann mittels Liganden-Bindungsstudien erbracht werden. So können
Membran-Fractionen von mit pDT94 transformierten *U. maydis* Zellen für
25 Bindungsstudien mit z.B. dem radioaktiv markierten β 2-AR-Liganden 3-[¹²⁵I]-
Iodocyanopindolol durchgeführt werden gemäss publizierten Protokollen [H.K.
Dohman, M.G. Caron, A. DeBlasi, T. Frielle and R.J. Lefkowitz (1990) Bio-
chemistry, 29, 2335-2342].

30

Der Nachweis, dass der in *U. maydis* exprimierte humane β 2-AR funktionell ist und mit der Pheromon-Signalübermittlungskette von *U. maydis* interagiert, kann nun erbracht werden, indem ein Pheromon-induzierbares Reportergen in die mit pDT94 transformierten *U. maydis* Zellen eingebracht wird. Das Plasmid pMU1 enthält das bakterielle *uidA* Gen, welches für das Enzym β -Glukuronidase (GUS) kodiert [R. A. Jefferson, S. M. Burgess and D. Hirsh (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8447-8451] und dessen Expression durch den stark Pheromon-induzierbaren Promotor des *mfal* Gens reguliert wird [M. Urban, R. Kahmann and M. Bölker (1996) Mol. Gen. Genet., 251, 31-37].

5 Demzufolge kann die Bindung eines β 2-AR Agonisten an den in *U. maydis* exprimierten β 2-AR nachgewiesen werden, indem *U. maydis* Transformanden, welche pDT94 und pMU1 enthalten, mit z.B. dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol stimuliert werden. Die Stimulation des Rezeptors kann somit durch einem einfachen biochemischen Test für GUS-Aktivität nachgewiesen

10 werden, wie z.B. beschrieben in A. Gururaj Rao and P. Flynn (1992) in GUS Protocols; S.R. Gallagher (ed.), Academic Press Inc., 89-99.

15

P A T E N T A N S P R Ü C H E

5

1. Transformierte Zell-Linie für den Nachweis von Wechselwirkungen mit GPC-Rezeptoren oder mit einem GPC-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungssystem, wobei die Zellen der transformierten Zell-Linie einen heterologen GPC-Rezeptor exprimieren sowie einen durch Stimulation des heterologen GPC-Rezeptors induzierbaren Promotor und ein durch den Promotor gesteuertes Reportergen aufweisen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen ein endogenes oder gentechnisch eingeführtes GPC-Rezeptor-kontrolliertes Signalübermittlungssystem mit positiver Rückkoppelung aufweisen.

15

2. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen das GPC-Rezeptor-kontrollierte Signalübermittlungssystem mit positiver Rückkoppelung natürlicherweise aufweisen.

20

3. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine Linie von *Ustilago maydis* ist.

25

4. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die positive Rückkoppelung im GPC-Rezeptor-kontrollierten Signalübermittlungssystem mittels genetischer Rekombination erzeugt ist.

30

5. Transformierte Zell-Linie nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der heterologe GPC-Rezeptor ein α -adrenerger Rezeptor, ein β -adrenerger Rezeptor, ein Adenosin-Rezeptor, ein Angiotensin-Rezeptor, ein Bradykinin-Rezeptor, ein Cannabinoid-Rezeptor, ein Chemokin-Rezeptor, ein Dopamin-Rezeptor, ein Glukagon-Rezeptor, ein Neurokinin-Rezeptor, ein Neurotensin-Rezeptor, ein Serotonin-Rezeptor, ein Opiat-Rezeptor, ein muskarinischer Rezeptor, ein Somatostatin-Rezeptor oder ein Vasopressin-Rezeptor ist.
6. Transformierte Zell-Linie nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen zusätzlich heterologe Untereinheiten von G-Proteinen exprimieren.
7. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen heterologe $G\alpha$ -Untereinheiten exprimieren, die G_s -, G_o -, G_q -, G_i - oder G_z -Untereinheiten sind.
8. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen heterologe $G\beta\gamma$ -Untereinheiten exprimieren.
9. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der durch Stimulation des heterologen GPC-Rezeptors induzierbare Promotor der Promotor des *Ustilago maydis* Gens *mfa1*, *mfa2*, *pra1*, *pra2* oder *prf1* ist.

10. Transformierte Zell-Linie nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das durch den Promotor gesteuerte Reportergen das lacZ-Gen, das hph-Gen, das ble-Gen, ein GFP-Gen oder das uidA-Gen ist.
- 5
11. Transformierte Zell-Linie nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das durch den Promotor gesteuerte Reportergen das pyr6-Gen von Ustilago maydis oder das pyr3-Gen von Ustilago maydis ist.
- 10
12. Vektor zur Herstellung der transformierten Zell-Linie gemäss einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Vektor zwischen einem Promotor und einem Terminator, die in einer zu transformierenden Zelle funktionell sind, eine heterologe, für einen GPC-Rezeptor kodierende DNA-Sequenz aufweist und ein Markergen.
- 15
13. Vektor nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Promotor und der Terminator Gene von Ustilago maydis Genen sind.
- 20
14. Vektor nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Promotor/-Terminator vom Ustilago maydis hsp70-Gen sind oder dass der Promotor der Arabinose-induzierbare Promotor des crg1-Gens von Ustilago maydis ist.
- 25
15. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Markergen das cbx-Gen von Ustilago maydis, das nat1-Gen von Streptomyces noursei oder das hph-Gen von Escherichia coli ist.
- 30

16. Vektor nach einem der Ansprüche 13 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die für einen heterologen GPC-Rezeptor kodierende DNA-Sequenz
ein Translations-Initiations Kondon mit einer Konsensus-Sequenz für
5 filamentöse Pilze aufweist.
17. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**,
dass der Vektor eine DNA-Sequenz die mindestens ein Segment der
10 aminoterminalen kodierenden Sequenz eines GPC-Rezeptors der zu
transformierenden Zelle beinhaltet und stromabwärts von dieser DNA-
Sequenz im korrekten Leseraster die für den heterologen GPC-Rezeptor
kodierende DNA-Sequenz aufweist.
18. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die DNA-Sequenz, die für einen heterologen GPC-Rezeptor kodiert,
für einen α -adrenergen Rezeptor, einen β -adrenergen Rezeptor, einen
Adenosin-Rezeptor, einen Angiotensin-Rezeptor, einen Bradykinin-Re-
20 zeptor, einen Cannabinoid-Rezeptor, einen Chemokin-Rezeptor, einen
Dopamin-Rezeptor, einen Glukagon-Rezeptor, einen Neurokinin-Rezep-
tor, einen Neutensin-Rezeptor, einen Serotonin-Rezeptor, einen Opiat-
Rezeptor, einen muskarinischen Rezeptor, einen Somatostatin-Rezeptor
oder einen Vasopressin-Rezeptor kodiert.
19. Verwendung der transformierten Zell-Linie nach einem der Ansprüche 1
bis 11 zum Nachweis von Wechselwirkungen von Testsubstanzen mit dem
heterologen GPC-Rezeptor oder mit dem GPC-Rezeptor-kontrollierten
30 Signalübermittlungssystem, wobei Testsubstanz und Zellen in Interaktion
gebracht und die Expression des Reportergens messtechnisch erfasst wird.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Reportergen ein essentielles Wachstumsenzym exprimiert und dass das Zellwachstum durch Trübungsmessung erfasst wird.

5

21. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des Reportergens einer biochemischen Reaktion unterzogen wird und das Reaktionsprodukt messtechnisch erfasst wird.

10

22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Reportergen das uidA-Gen ist und für β -Glukuronidase kodiert und dass die exprimierte β -Glukuronidase mit einem geeigneten biochemischen Test erfasst wird.

15

USTILAGO

HEFE

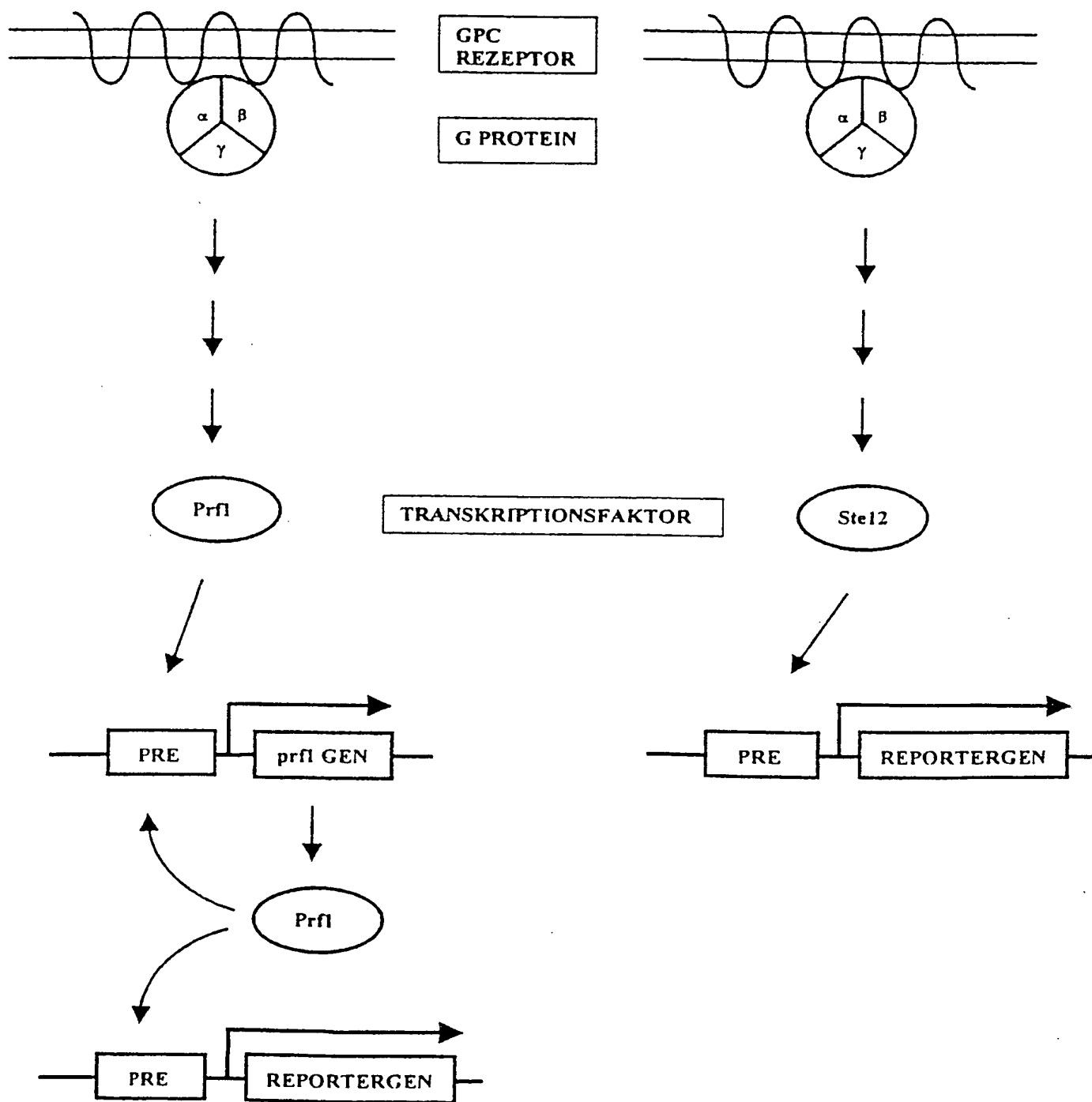


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/CH 99/00246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N5/10 C12N1/15 C12N15/63 C12N15/80 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 05244 A (UNIV DUKE) 2 April 1992 (1992-04-02) cited in the application the whole document ---	1,2,4-8, 10,12, 15,17-22
X	WO 92 01810 A (LERNER MICHAEL R ; LERNER ETHAN A (US)) 6 February 1992 (1992-02-06) the whole document ---	1,2,4-8, 10,12, 15,17-22
X	US 5 242 822 A (EMORINE LAURENT ET AL) 7 September 1993 (1993-09-07) the whole document ---	1,2,4-8, 10,12, 15,17-22



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 1999

Date of mailing of the international search report

15/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH 99/00246

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 98 29439 A (SULLIVAN KATHLEEN ;MERCK & CO INC (US); TAN CARINA (US)) 9 July 1998 (1998-07-09) the whole document -----</p>	<p>1,2,4, 12,17, 19,21</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 99/00246

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9205244 A	02-04-1992	AU 652576 B AU 8511591 A CA 2092717 A EP 0548165 A JP 6500693 T US 5482835 A US 5739029 A	01-09-1994 15-04-1992 14-03-1992 30-06-1993 27-01-1994 09-01-1996 14-04-1998
WO 9201810 A	06-02-1992	US 5462856 A CA 2087614 A EP 0539518 A JP 6502757 T	31-10-1995 20-01-1992 05-05-1993 31-03-1995
US 5242822 A	07-09-1993	FR 2628750 A AT 141331 T DE 68926931 D DE 68926931 T EP 0344024 A JP 2009375 A	22-09-1989 15-08-1996 19-09-1996 06-03-1997 29-11-1989 12-01-1990
WO 9829439 A	09-07-1998	WO 9829440 A WO 9829441 A	09-07-1998 09-07-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 99/00246

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N5/10 C12N1/15 C12N15/63 C12N15/80 C12Q1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 05244 A (UNIV DUKE) 2. April 1992 (1992-04-02) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1, 2, 4-8, 10, 12, 15, 17-22
X	WO 92 01810 A (LERNER MICHAEL R ; LERNER ETHAN A (US)) 6. Februar 1992 (1992-02-06) das ganze Dokument ---	1, 2, 4-8, 10, 12, 15, 17-22
X	US 5 242 822 A (EMORINE LAURENT ET AL) 7. September 1993 (1993-09-07) das ganze Dokument ---	1, 2, 4-8, 10, 12, 15, 17-22

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

² Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Oktober 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

*nationales Aktenzeichen

PCT/CH 99/00246

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>WO 98 29439 A (SULLIVAN KATHLEEN ;MERCK & CO INC (US); TAN CARINA (US)) 9. Juli 1998 (1998-07-09) das ganze Dokument -----</p>	<p>1,2,4, 12,17, 19,21.</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 99/00246

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9205244 A	02-04-1992	AU 652576 B	01-09-1994
		AU 8511591 A	15-04-1992
		CA 2092717 A	14-03-1992
		EP 0548165 A	30-06-1993
		JP 6500693 T	27-01-1994
		US 5482835 A	09-01-1996
		US 5739029 A	14-04-1998
WO 9201810 A	06-02-1992	US 5462856 A	31-10-1995
		CA 2087614 A	20-01-1992
		EP 0539518 A	05-05-1993
		JP 6502757 T	31-03-1995
US 5242822 A	07-09-1993	FR 2628750 A	22-09-1989
		AT 141331 T	15-08-1996
		DE 68926931 D	19-09-1996
		DE 68926931 T	06-03-1997
		EP 0344024 A	29-11-1989
		JP 2009375 A	12-01-1990
WO 9829439 A	09-07-1998	WO 9829440 A	09-07-1998
		WO 9829441 A	09-07-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.